

氏 名	金 岡 恵 理
生 年 月 日	
本 籍	京 都 府
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 274 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	論文博士 (学位規則第 4 条第 2 項)
学位授与の題目	微小リポソームの生物薬剤学的有用性と薬剤キャリアーとしての応用の可能性
論文審査委員(主査)	辻 彰 (薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一 (医学部附属病院・教授) 中垣 良一 (自然科学研究科・教授) 松下 良 (自然科学研究科・助教授) 加藤 将夫 (薬学部・助教授)

学 位 論 文 要 旨

Summary

Recombinant human interleukin-2 (IL-2) and recombinant human interferon- γ (IFN- γ) were found to associate with small liposomes (size: 20-50 nm) strongly and almost completely due to their hydrophobicity. Commercial lyophilized IL-2 (Imunace[®]) and IFN- γ (Imunomax[®]) are highly associated to liposomes by merely mixing under the optimal conditions, respectively.

When IL-2 associated to liposome (DSPC/DSPG(10:1); liposomal IL-2) was administered intravenously to mice, it was eliminated slowly from the systemic circulation, delivering to the liver and spleen more than IL-2 alone, 13 and 18 times respectively. These resulted in that liposomal IL-2 was significantly more effective (8 times) than IL-2 alone for inhibiting against the experimental metastases of M5076 in mice. After subcutaneous administration of liposomal IL-2 to mice, the mean residence times (MRT) of IL-2 in systemic circulation and dosing area under the skin were about 8 times longer than that of IL-2 alone.

IFN- γ aerosolized by a nebulizer is very unstable. The stability of IFN- γ in a jet nebulizer was significantly improved by adding small liposomes (HSPC/DSPG(10:1)). The results of gel permeation chromatography suggested that IFN- γ was stabilized because of suppression of its polymerization or aggregation by liposomes.

These small liposomes could be produced by a high-pressure homogenization method using a Microfluidizer[®]. They are stable in glass ampoules until a year at 4 °C.

These liposomes should be utilized as a carrier for peptides such as IL-2 and IFN- γ .

[緒言]

リポソームは、イオンなどに対してバリアー能を有する閉鎖小胞であり、親水性および疎水性のいずれの性質を有する薬物も含有できるという特長から、薬剤キャリアーとして長年研究対象とされてきた。その成果として、国外では、Ambisome® や Doxil® がすでに市販されているが、国内では未だ市販されるには至っていない。上市されているものが少ない理由として、一般に親水性薬物の水相への内包率は低く、また脂質相への取り込み率は薬物の性質に依存するところが多いことがあげられる。また、内包物質の漏れや回収率の観点から、製剤化にあたってクリアすべき問題が多く存在すると考えられる。

遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-2（以下 IL-2 と略す）および遺伝子組換え型ヒトインターフェロン-γ（以下 IFN-γ と略す）は、すでに血管肉腫あるいは腎癌に対する有効性が認められ医薬品として市販されている（イムネース®注、イムノマックス®-γ注）サイトカイン類に属するペプチドである。また、これらサイトカイン類は免疫増強作用や、腫瘍細胞増殖を抑制する作用を有していることから、その他の癌に対しても適用拡大の試みが続けられている。しかしながら IL-2 は生体に投与した際に、血中から非常に速やかに消失することが知られており、効果の増強を目的として種々の動態改善を対象とした研究も行われている。また、一方 IFN-γ はペプチド構造内に Cys を有するため、物理的ストレスなどを受けると、互いに架橋し 2 量体や 3 量体を形成し不活性化することが欠点として知られている。

このような背景のもと、IL-2 や IFN-γ などペプチドの抱える問題点を改善する目的で、両ペプチドが共に構造中に疎水領域を有するという性質と、親水性のみならず疎水性を有するリポソームとの組み合わせに着目し種々の検討を行った結果、ペプチドを内包するのではなく、別に調製したリポソーム分散液に単に混合するのみで安定で強い吸着体の得られることを見出した。またこれら吸着体は生物薬剤学的、製剤学的に有用な性質を示すことが明らかになったので、以下にその研究内容をまとめる。

[IL-2 および IFN-γ とリポソームとの相互作用]

EggPC, DMPC, DPPC, DSPC の 4 種のリポソームを 100 nm サイズで調製し、¹²⁵I-IL-2 と混合した（混合比率：0.5 JRU/nmole）場合の相互作用をゲル濾過により評価した（Fig.1）。各分画中の ¹²⁵I-IL-2 濃度およびリポソーム濃度を定量し、吸着率（Associated %：式 1）を算出した。

$$\text{Associated \%} = 100 \times \frac{C_{\text{lipo, IL-2}} / C_{\text{lipo, liposome}}}{C_{\text{I, IL-2}} / C_{\text{I, liposome}}} \quad (\text{式 1})$$

$C_{\text{lipo, IL-2}}$, $C_{\text{lipo, liposome}}$: liposome 分画中の IL-2 およびリポソーム濃度

$C_{\text{I, IL-2}}$, $C_{\text{I, liposome}}$: ゲル濾過にける前の IL-2 およびリポソーム濃度

DSPCリポソームと混合した ^{125}I -IL-2はほとんどリポソーム分画に検出され、ほとんどすべてリポソームに吸着していることが分かった。相互作用の大きさは、 $\text{DSPC} \geq \text{DPPC} > \text{DMPC} > \text{EggPC}$ の順であった。また、リポソームの分散性を良くする目的で加えた負荷脂質DPPGの相互作用に対する影響はなかった。IL-2の非標識体についても同様の結果を得た (Table 1)。また、DSPC/DSPG(10:1)のリポソームを3種類のサイズ (30, 100, 1000 nm) で調製し、一定の割合 (7 JRU/nmole) で混合した時の IL-2 の吸着量をゲル濾過により評価した。IL-2 の吸着量はリポソームのサイズが小さいほど大きく、リポソームの有する表面積に比例することが分かった。以上のことから、IL-2 はリポソーム分散液と単に混合するのみで吸着体 (以後 Liposomal IL-2 と称する) を形成し、その吸着の主要因は静電的相互作用ではなく、疎水的相互作用によると考えられた。IL-2 の凍結乾燥製剤であるイムネース[®]注にDSPC/DSPG(10:1)の組成からなる微小なサイズ (20-50 nm) のリポソーム分散液を0.2-10 JRU/nmoleの比率で添加した場合、常に高い吸着率 (>90%) で吸着体を得られた。

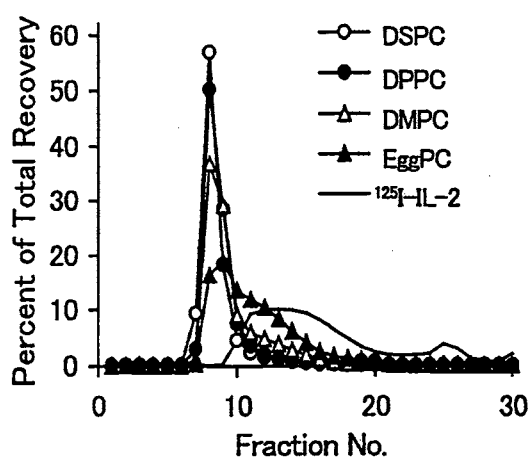


Fig. 1 Gel filtration chromatography of ^{125}I -IL-2 and its mixtures with four kinds of liposomes. The percentage of ^{125}I -IL-2 in each fraction to the total ^{125}I -IL-2 recovery was plotted. The ratio of IL-2 to liposome: 0.5 JRU/nmole. —: ^{125}I -IL-2. ○: the mixture of ^{125}I -IL-2 and DSPC liposome. ●: the mixture of ^{125}I -IL-2 and DPPC liposome. △: the mixture of ^{125}I -IL-2 and DMPC liposome. ▲: the mixture of ^{125}I -IL-2 and EggPC liposome.

Table 1 Percentage of IL-2 associated to liposome

Liposome	Associated %
EggPC/DPPG (3:1)	2
DPPC/DPPG(10:1)	54
DSPC/DPPG(10:1)	85
DSPC/DSPG(10:1)	94
DSPC	95

The percentage of IL-2 associated to liposome was calculated from the results of gel filtration chromatography using Eq. 1 in the part of methods and materials. The ratio of IL-2 to liposome: 7 JRU/nmole. Liposome size: about 100 nm.

IFN- γ の凍結乾燥製剤であるイムノマックス[®]- γ 注にHSPC/DSPG(10:1)の組成からなる微小な (20-50 nm) リポソーム分散液を添加するのみで、強い吸着体 (以後 Liposomal IFN と称する) を生成し、20JRU/nmoleの比率で混合した場合には、IFN- γ はほとんど100% 吸着した。このような疎水性に基づくと考えられるペプチドとリポソームとの相互作用は、疎水性アミノ酸を構成成分として疎水領域を有するペプチド類に共通して見られる可能性が高いと考えられた。

[Liposomal IL-2 の生物薬剤学的有用性]

イムネース[®]注にDSPC/DSPG(10:1)の組成からなる微小なサイズ (20-50 nm) のリポソーム分散液を加えて得られる Liposomal IL-2 (IL-2/liposome 混合比

率：4-6 JRU/nmole) をマウスに静脈内投与または皮下投与した場合いずれにおいても、IL-2 単独投与に比べ、血中滞留性を増大させるという効果を示した (Fig.2, Fig.3)。静脈内投与ではさらに肝臓、脾臓の滞留性・移行性も増大し、その結果、M5076のマウス肝転移モデルにおいて、IL-2として5,000 JRU/mouse per dayの以上の投与量で10日間治療した場合、Vehicle投与群に比べ有意 ($p<0.001$) に肝転移を抑制し、その抗腫瘍効果は有効投与量 (ED_{50}) で比較するとIL-2単独投与とLiposomal IL-2 投与でそれぞれ12,500および1,640 JRU/mouse per dayであり、Liposomal IL-2 では約8倍その効果が増大した。皮下投与による抗腫瘍効果は調べていないが、血中滞留性の増大は静脈内投与の場合に比べさらに大きかったので、より大きな効果の得られる可能性があると考えられる。

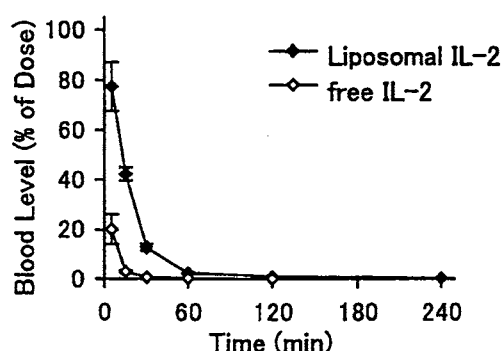


Fig. 2 Blood level of IL-2 after intravenous administration of free IL-2 and liposomal-IL-2 to mice (N = 3). \circ : free IL-2. Dose: 5×10^5 JRU/kg. \bullet : Liposomal IL-2. Dose: 5×10^5 JRU/kg. 125 μ moles lipid/kg, liposome: DSPC/DSPG (10:1).

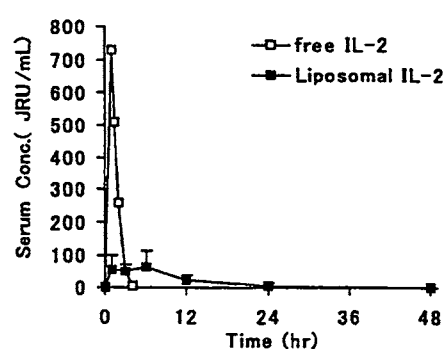


Fig. 6 Time courses of serum concentration of IL-2 after subcutaneous administration of free IL-2 and liposomal IL-2 to mice. Dose of free IL-2: 1.5×10^6 JRU/kg. (N = 2), dose of liposomal IL-2: 1.75×10^6 JRU/kg. 300 μ moles lipid/kg, liposome: DSPC/DSPG (10:1), (N = 3)

[Liposomal IFN- γ の製剤学的有用性]

IFN- γ が吸入療法に使用される場合、溶液としてネブライザーによりエアロゾル化すると、非常に不安定であることが知られている。そこで、リポソームとの吸着体 (Liposomal IFN) による安定化を試みた。HSPC/DSPGおよびDSPC/DPPG(10:1)組成の微小 (20-50 nm) リポソームをIFN- γ 溶液に添加する (Liposomal IFN) ことにより、ネブライザー使用時のIFN- γ は著しく安定化し、ネブライザーの薬剤槽の薬剤残存率および生成したエアロゾルを捕集して求めた噴霧率は増大した (Fig.4a,b, Table 2)。安定化効果は、IFN- γ とリポソームの混合比が40 JRU/nmole以下の時に得られた。この安定化はリポソームとの吸着によるIFN- γ の多量体化の抑制によると推察された。また、本安定化は、エアロゾルの肺内到達部位を規定する重要な因子であるエアロゾル粒子径を変化させないものであったことが意義深いと考える。

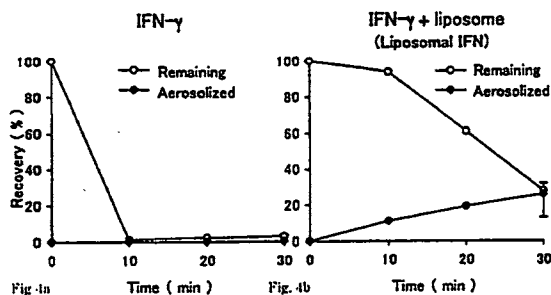


Fig. 4a Stability of IFN- γ during nebulization by jet nebulizer. Each point represents the mean value, N=2 or 3. IFN- γ : 5×10^6 JRU/mL, 5 mL. -○-: recovery of IFN- γ remaining in reservoir. -●-: recovery of aerosolized IFN- γ .

Fig. 4b Stability of IFN- γ with liposome. Each point represents the mean value, N=2,3. IFN- γ : 5×10^6 JRU/mL. Liposome: HSPC/DSPG=10/1, 25 μ mole/mL. -○-: recovery of IFN- γ remaining in the reservoir. -●-: recovery of aerosolized IFN- γ .

Table 2 Stability of IFN- γ in the jet nebulizer

Liposome	% of Recovery			
	Remining		Aerosolized	
	Immunoassay	Bioassay	Immunoassay	Bioassay
None	3.1 ± 0.7	3.0	0.4 ± 0.2	N.M.
HSPC/DSPG	27.2 ± 4.7	60.8	25.7 ± 12.6	57.0
DSPC/DPPG	29.8 ± 2.6	N.M.	43.1 ± 16.6	N.M.
EggPC/DSPG	16.2 ± 13.0	N.M.	15.8 ± 2.6	N.M.
EggPC	3.7 ± 1.0	N.M.	1.2 ± 0.4	N.M.

The % of remaining in the reservoir and the % of aerosolized IFN- γ are listed with or without liposome after nebulization for 30 min in the jet nebulizer. IFN- γ was 5.0×10^6 JRU/mL and liposome was 25 μ mole/mL. IFN- γ was measured by immunoassay or bioassay. The values represent mean \pm SD (N=3) and mean (N=2). N.M.: not measured.

[微小リポソーム調製法と保存安定性]

DSPC/DSPG, DSPC/DPPG, HSPC/DSPG(10:1)組成の微小 (20-50 nm) リポソーム分散液は、高圧乳化法により静脈内投与可能な製剤として大量に供給可能で、アンプルに封入した状態では冷所に1年まで保存可能であった。各リン脂質としての残存率は90% 以上でリポソーム粒子径もほとんど変化しなかった。また1年保存後に測定した IL-2 吸着率は、保存前のリポソームについて評価した結果とほとんど変わらなかった。

以上、高圧乳化法により大量調製可能な微小 (20-50 nm) リポソームはIL-2やIFN- γ などの疎水領域を有するペプチド類と用時に混合するのみで吸着体を形成することを見出した。吸着体 Liposomal IL-2 を生体内投与時には、血中滞留性の増大などの体内動態を改善することが可能で、その結果抗腫瘍効果を増大させることができた。また、吸入療法においてはIFN- γ の安定なエアロゾル化など製剤学的な効果をもたらす能力も有しており、これら吸着体は、生物薬剤学的・製剤学的領域において広く利用できることを示した。また本効果はIL-2やIFN- γ にとどまらず、疎水領域を有する他のペプチド類にも応用できる可能性があり、薬剤を入れて調製した後の保存安定性などを特に検討する必要のない用時調製型リポソームキャリアの有用性を示すことができた。なお、以上の研究内容は下記特許公報にて公開中である。

地蔵本博章、吉川剛兆、金岡恵理、平野耕一郎、特願平7-198764、出願日平成7年8月3日

長田俊治、金岡恵理、特願平9-148346、出願日 平成9年6月6日

学位論文審査結果の要旨

リボソームを薬物キャリアーとして用いる研究は広範に行われているが、ペプチドのキャリアーとしての応用性や製剤化についての研究は少ない。本研究では、サイズ 20 ～ 50nm のリボソームが遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-2（以下 IL-2）およびインターフェロン- γ （以下 IFN- γ ）などの生理活性ペプチドを内包させることなく、単に混合するのみで以下に示す特長を有する吸着体が得られるという新規な知見を得た。

- (1) 高圧乳化法により大量調製可能で安定な微小（20 ～ 50nm）リボソームが組成や混合比を最適化することにより、IL-2 や IFN- γ などの疎水領域を有するペプチド類と用時に混合するのみで、効率で安定な吸着体を形成する。
- (2) IL-2 をリボソーム吸着体として静脈内または皮下に投与したとき、それらの血中滞留性などの体内動態改善が見られ、その結果、抗腫瘍効果が著しく改善した。
- (3) リボソーム吸着体は、ネブライザー使用時に、IFN- γ を著しく安定化し、吸入剤として利用可能であることを示した。

以上の研究成績は、ペプチド類の用時溶解型微小リボソーム吸着体が、それらの体内動態の制御による薬効の増大、物理的ストレスに対する安定化など、様々な生物薬剤学的あるいは製剤学的特長を有することを初めて明らかにしたものであり、生理活性ペプチド製剤の開発に新しい指針を与えるものと高く評価されるので、本論文は博士（薬学）に値するものと判断する。